

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-173185

(43) 公開日 平成7年(1995)7月11日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 F 15/00		A 9155-4H		
		D 9155-4H		
G 0 1 N 21/76				
33/532	B			
33/58	A			

審査請求 有 発明の数 7 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願平6-235511
(62) 分割の表示	特願平4-351891の分割
(22) 出願日	昭和60年(1985)10月30日
(31) 優先権主張番号	6 6 6 9 8 7
(32) 優先日	1984年10月31日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)
(31) 優先権主張番号	7 8 9 1 1 3
(32) 優先日	1985年10月24日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

(71) 出願人	593006353 イゲン、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 20852 メリーランド州、 ロックビル、イースト ジェファークソン ストリート 1530
(72) 発明者	バード、アレン・ジェイ。 アメリカ合衆国、テキサス・78731、オー ステイン、マウンテン・クライム・ドライ ヴ・6202
(72) 発明者	ホワイトサイズ、ジョージ・エム。 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 02158、ニュートン、グラスミア・ストリ ート・124
(74) 代理人	弁理士 浅村 皓 (外3名)

(54) 【発明の名称】 発光性金属キレート標識及び検出手段

(57) 【要約】

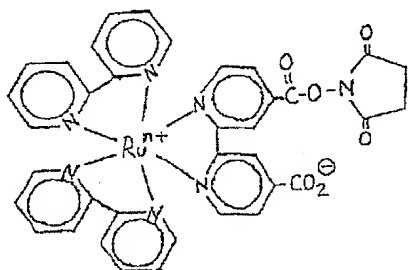
【目的】 電気化学ルミネセンスラベルが提供される。

【構成】 R u -含有有機金属化合物及びO s -含有有機金属化合物は電気化学ルミネセンスラベルとして有用であり、このようなラベルを用いることにより感度が高く、安全で安価な分析が可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式

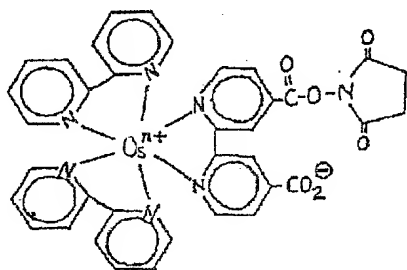
【化 1】



(ここでnは1、2または3の整数である)の構造を有する化合物およびその塩類。

【請求項 2】 下記式

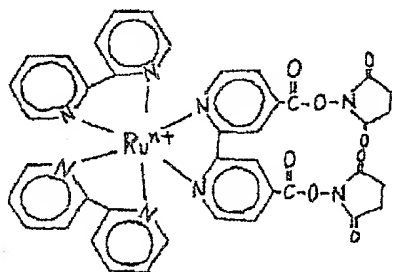
【化 2】



(ここでnは1、2または3の整数である)の構造を有する化合物およびその塩類。

【請求項 3】 下記式

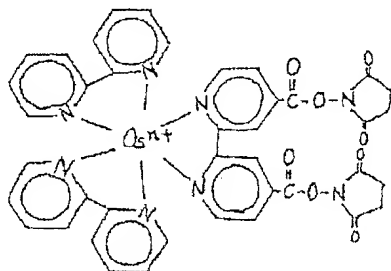
【化 3】



(ここでnは1、2または3の整数である)の構造を有する化合物およびその塩類。

【請求項 4】 下記式

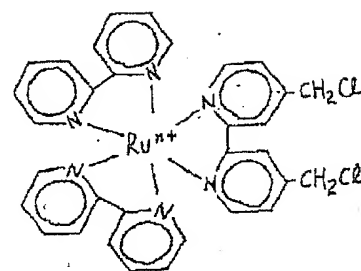
【化 4】



(ここでnは1、2または3の整数である)の構造を有する化合物およびその塩類。

【請求項 5】 下記式

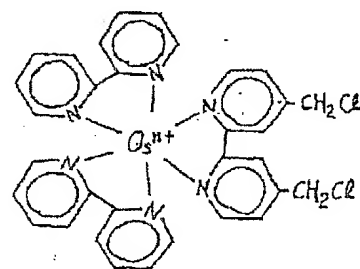
【化 5】



(ここでnは1、2または3の整数である)の構造を有する化合物およびその塩類。

【請求項 6】 下記式

【化 6】



(ここでnは1、2または3の整数である)の構造を有する化合物およびその塩類。

【請求項 7】 対イオンがNH₄⁺、ゲアニジニウム、Li⁺、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺もしくはCd²⁺カチオン、またはOH⁻、SO₄²⁻、ハライド、カーボネート、ヘキサフルオロホスフェートもしくはテトラフルオロボレートアニオンである請求項1、2、3、4、5または6の塩。

【請求項 8】 次式を有する化学種

【化 7】 {M(P)_m(L¹)_n(L²)_p(L³)_q(L⁴)_r(L⁵)_s(L⁶)_t(B)_u}

〔式中、Mはルテニウムまたはオスミウムであり、PはMの多座配位であり、L¹、L²、L³、L⁴、L⁵およびL⁶はMのリガンドであって各々同一でもまたは互いに他のリガンドと異なってもよく、Bは1個以上のアミド結合またはアミン結合を介してP、L¹、L²、L³、L⁴、L⁵またはL⁶の1個以上と共有結合している物質であり、mは1以上の整数であり、n、o、p、q、rおよびsの各々はゼロまたは整数であり、tは1以上の整数であり、uは1以上の整数であり、P、L¹、L²、L³、L⁴、L⁵、L⁶およびBは電磁放射線を放出させるべくこの化学種を誘導できるような組成と数になっており、MのリガンドとMとの結合の総数はMの配位数に等しい〕と、各々異なる波長の電磁放射線を放出させるべく誘導することができるいろいろな化学種の1種以上とからなる組成物。

【請求項 9】 前記化学種が各々異なる対象分析物に結合している請求項8の組成物。

【請求項 10】 いろいろな化学種を異なる値のエネル

ギーまたは異なるエネルギー源からのエネルギーに曝露することによって誘導して電磁放射線を放出させる請求項8の組成物。

【請求項11】 化学種が各々異なる物質に結合している請求項10の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】本出願は1984年10月31日出願の米国シリアルNo. 666, 987の部分的継続出願であり、前記No. 666, 987は本出願に参考として包含される。化学的、生化学的及び生物学的物質を短時間で極めて特異的に検出し且つ計量せしめる方法の必要性は益々高くなってきている。特に重要なのは少量の薬物、代謝物質、微生物及び他の診断上重要な物質を測定する方法である。この種の物質としては、例えば麻酔薬及び毒薬、治療用として投与された薬剤、ホルモン、病原となる微生物及びウイルス、抗体、代謝物質、酵素並びに核酸が挙げられる。

【0002】これらの物質の存在はしばしば、多くの生化学的系及び生物学的系の特徴をなす高度の特異性を利用する結合法によって測定できる。頻繁に使用される方法は例えば抗原-抗体システム、核酸ハイブリダイゼーション技術、及びタンパク質-リガンドシステムに基づくものである。これらの方法では診断上重要な複合体の存在が通常、複合体構成物質の1つ又は複数に結合された観察可能ラベル（標識）の存在又は不在によって示される。選択された特定ラベリング（標識）法はしばしば問題の物質の特定検出システムの有効性及び多目的性を支配する。好ましい標識は安価、安全であり、且つ広範囲にわたる化学的、生化学的及び生物学的物質にこれら物質の重要な結合特性を変化させることなく効果的に結合され得るという条件を満たさなければならない。この好ましいラベルは極めて特徴的なシグナルを与えるものでなければならず、且つ自然界に余り見られない、又は好ましくは全く存在しないものであることが望まれる。このラベルはまた、安定性を有し且つ数箇月にわたって水性システム内で検出できるようなものでなければならない。ラベルの検出は高価な専用設備又は人員を必要とせず短時間で、高感度及び再現性をもって実施されることが望まれる。ラベルの計量は温度及びアッセイされる混合物の組成のごとき変数に余り左右されないことが重要である。最も有利なものは、均質系即ち複合体状のラベルされた物質及び非複合体状のラベルされた物質を分離する必要のない系で使用できるラベルである。これはラベルされた物質が特定複体内に合体された時にラベルの検出性が変化しても可能である。

【0003】これまでも様々なラベルが開発されてきたが、これらのラベルはいずれも特定の利点及び欠点を有する。例えば、放射性ラベルは使用範囲がかなり広く、且つ極めて低い濃度で検出できる。しかしながらこ

の種のラベルは高価で危険性もあり、その使用には精巧な設備と熟練した人員とが必要とされる。更に放射性ラベルの感度は、検出し得る事象がその本質的性質上ラベルされた物質の放射性原子1つ当たり1度の割合でしか生起し得ないため限定される。加えて、放射性ラベルは均質法では使用し得ない。

【0004】そこで非放射性ラベルが注目される。この種のラベルは分光測光法、スピン共鳴法及びルミネセンス法により観察し得る分子、並びにこれらの分子を産生する酵素を含む。有用な非放射性ラベリング物質の1つに有機金属化合物がある。生物系ではある種の金属は希であるため、有機金属化合物の金属成分を特異的にアッセイする方法が有効に使用される。例えば、Caiの米国特許第4, 205, 952号には、特定抗原の定量に使用するための特定有機金属化合物でラベルされた免疫化学的活性物質の使用が開示されている。これらのラベルには、発光スペクトル、吸光スペクトル及び蛍光スペクトルの測定、原子吸光並びに中性子活性化を含めて、通常の選択金属検出法のいずれも使用できる。これら通常の方法はしばしば感度に欠け、均質系にはほとんど使用し得ず、且つ原子吸光の場合のごとく、時として試料の破壊を生起する。

【0005】特に有利なラベルは、光化学的手段、化学的手段及び電気化学的手段によって発光させ得るラベルである。“ホトルミネセンス”は物質が電磁放射線（電磁波）を吸収した時に発光するように誘導されるプロセスである。蛍光及びリン光はホトルミネセンスの一種である。化学ルミネセンスはエネルギーの化学的移行によって発光種を発生させるプロセスである。電気化学ルミネセンスは電気化学的に発光種を発生させる。

【0006】これら発光システムの重要性は益々高まってきた。例えばMandleの米国特許第4, 372, 745号には免疫化学的用途における化学発光性ラベルの使用が開示されている。このシステムではラベルが化学的手段、例えばラベルと H_2O_2 及びシュウ酸（オキサレート）との反応によって発光状態に励起される。これらのシステムでは H_2O_2 がシュウ酸を高エネルギー誘導体に酸化的に変換し、この誘導体がラベルを励起する。このシステムは原則として、このアッセイの酸化性条件下で安定性を示し且つ高エネルギーシュウ酸誘導体により励起され得る発光物質のいずれに対しても有効である。ところが残念なことに、この広範囲な利用性自体がこの方法を大きく限定する。即ち、問題のアナライト（対象分析物、analyte）を含む通常の生物学的流体は潜在的発光物質も多く含み、これらの物質が大きなバックグラウンドレベルのルミネセンス（発光）を誘起し得るのである。

【0007】同様の欠点を有する化学ルミネセンスの免疫化学的使用の別の例がOberhardt他の米国特許第4, 280, 815号に開示されている。この場合

は化学発光種でラベルされた免疫反応物の極めて近く、その場で酸化体（例えば H_2O_2 ）を電気化学的に形成せしめる。電気的に発生した酸化体は化学発光種内に向かって拡散してこれを化学的に酸化し、その結果1つ以上の電子がこの電気的発生酸化体に移行する。前記化学発光種は酸化されると光子を放出する。これに対しこの発明では、電子を電気化学的エネルギー源から光子を繰り返し放出し得る化学発光種に直接移行しなければならない。

【0008】本発明は電気化学ルミネセンスラベルに係わる。適切なラベルは有機化合物及び有機金属化合物を含む電気化学発光性化合物からなる。ラベルされた物質の存在を決定する電気化学ルミネセンス法は多くの理由から他の方法より好ましい。即ちこの種の方法は特定ラベルの存在を極めて良く診断し得、感度が高く安全、安価であると共に使用範囲が広い。電気化学的ラベルに適した有機化合物としては例えばルブレン及び9, 10-ジフェニルアントラセンが挙げられる。多くの有機金属化合物が適切な電気化学的ラベルを構成するが、特に有用なものはRu-含有化合物及びOs-含有化合物である。本発明は種々の方法によって検出し得るRu-含有及びOs-含有ラベルの使用に係わる。これらのラベルは後述の種々の理由から有利である。

【0009】Ru-含有有機金属化合物及びOs-含有有機金属化合物についてはこれまでも文献で議論されてきた。Caisの開示によれば、第VIII属の貴金属、例えばRuを含む任意の金属元素又は複数の金属元素の組み合わせは原子吸光法によって検出し得る有機金属ラベルの適切な成分となる（Cais, 11欄、20行目）。しかしながらルテニウムはCaisにおいては好ましい金属ではなく、オスミウムについては特に記述がなく、開示されているいずれの方法でもRu及びOsの使用の効果についてのデータが全く示されていない。また、好ましいとされている検出法、即ち原子吸光法は試料を破壊する。

【0010】Weberの米国特許第4, 293, 310号はイムノアッセイにおけるアナライト用の電気化学的ラベルとしてのRu-含有複合体及びOs-含有複合体の使用を開示している。開示されている複合体はチオ尿素結合を介してアナライトのアミノ基に結合される。Weberはまた、ラベルと別のアナライトのヒドロキシ基との間でのカルボン酸エステル形成の可能性について示唆している。Weberによれば、ラベルされた物質の存在は消光剤と光手段付き電気化学的フローセル

（電池）とからなる装置及び方法によって決定し得る。光電気化学的活性ラベルは光励起すると電子を消光剤分子に移行させる。酸化された分子は次いで、適切な電位（ポテンシャル）に保持されたフローセルの電極からの電子によって還元される。この電子は光電流として決定される。このシステムのラベルされた遊離アナライトの

量は光電流信号によって測定される。この方法は発光物質の電気化学発光検出法の逆の方法であることに留意されたい。

【0011】Weber他によるその後の報告（1983年）Clinical Chemistry 29, pp. 1665-1672, Photoelectroanalytical Chemistry: Possible Interferences in Serum and Selective Detection of Tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) in the Presence of Interferentsでは、Ru-含有ラベルの検出にこの方法を使用することに伴う問題が議論された。Weber等の表2によれば、トリス（ビピリジル）ルテニウム（II）の補外検出限度は最適条件下で 1.1×10^{-10} モル/Lである。これらのラベルの実際的使用により複合体混合物の存在が測定されることを期待して、Weber等は彼等のシステムにおける潜在的干渉物質（interferent）をテストした。Weber等の表3には、ジメチルアルキルアミン、EDTA、N-メチルモルホリン、N, N'-ジメチルピペラジン、水酸化物、シュウ酸（塩）、アスコルビン酸（塩）、尿酸、及び血清が、実際の検出限度を 1.1×10^{-10} モル/Lよりかなり上昇させ得る干渉物質として列挙されている。

【0012】これらの研究は簡単なRu-含有化合物を用いて行なわれた。Ru-含有ラベルでラベルした複雑な物質の検出限度について、又はラベルされた物質とラベルとの間のチオ尿素結合がこのアッセイの条件下で安定しているか否かについては、Weber又はWeber等による研究では全く報告されていない。

【0013】本発明に係わる特定のラベルは電気化学発光ラベルである。これらのラベルはしばしば、化合物を電磁放射線又は化学的エネルギー源、例えば典型的シュウ酸- H_2O_2 システムによって形成されるものに曝すことによって、酸化又は還元されることなく、発光状態に励起され得る。加えて、これら化合物のルミネセンスはこれら化合物の酸化又は還元を伴う電気化学的方法によって誘起され得る。

【0014】光ルミネセンス、化学ルミネセンス及び電気化学ルミネセンス手段を用いるRu (2, 2'-bipyridine)₃2+検出法に関する研究も報告されている：Rubinstein及びBardの“Electrogenerated Chemiluminescence. 37. Aqueous Ecl Systems based on Ru (2, 2'-bipyridine)₃2+ and Oxalate or Organic Acids”, J. Am. Chem. Soc., 103, pp. 512-516 (1981年)、並びにWhite及びBardの“Electrogener

ated Chemiluminescence. 4
1. Electrogenenerated Chemiluminescence and Chemiluminescence of the $\text{Ru}(2, 2' - \text{bpy})_3^{2+} - \text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ System in Acetonitrile-Water Solution", J. Am. Chem. Soc., 104, p. 6891 (1982年)。この研究は明るいオレンジ色の化学ルミネセンスが化学的又は電気的に発生した $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (式中, "bpy" はビピリジルリガンドを表す) と、シュウ酸イオン又は他の有機酸の酸化の中間生成物として形成される強い還元剤との水性反応に基づき得ることを示している。ルミネセンスは電気的又は化学的に発生した $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{1+}$ とペルオキシジスルフェートの還元の間には発生する強い酸化剤との反応によって有機溶媒- H_2O 溶液中でも得られる。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ からの電気化学ルミネセンス発生の第3のメカニズムは $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{1+}$ を発生させるに十分な負の電位と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ を発生させるに十分な正の電位との間の電極電位振動を利用する。これら3つの方法は夫々“酸化還元”、“還元酸化”、及び“ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}/+$ 再生システム”と称する。

【0015】酸化還元法は水中で実施し得、酸素又は不純物の存在に比較的感応し難く強く効果的で安定したルミネセンスを生起する。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ からのこのルミネセンスはシュウ酸又は他の有機酸、例えばビルビン酸(ビルベート)、乳酸(ラクテート)、マロン酸(マロネート)、酒石酸(タートレート)、クエン酸(シトレート)の存在と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 種を酸化的に産生する手段とに依存する。この酸化は PbO_2 又は Ce(IV) 塩のような強い酸化剤によって化学的に実施し得、また連続的又は断続的に加えられる十分に正の電位により電気化学的に実施し得る。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の電気化学的酸化に適した電極は例えばPt、熱分解グラファイト、及びガラス質炭素である。シュウ酸又は他の有機酸は化学ルミネセンスの間に消耗されるが、消耗物質の過剰の存在又は反応室内への消耗物質の連続的供給により、何時間にもわたる強く一定した化学ルミネセンスが生起し得る。

【0016】還元酸化法は例えばアセトニトリルのごとき有機共存溶媒を含む部分的な水性溶液中で実施し得る。このルミネセンスはペルオキシジスルフェートの存在と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{1+}$ 種を還元的に産生する手段とに依存する。この還元は例えばマグネシウム又は他の金属のごとき強い還元剤によって化学的に実施し得、また連続的又は断続的に加えられる十分な負の電位により電気化学的に実施し得る。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の電気化学的還元に適した電極としては例えば磨いたガラス質炭素電極が挙げられる。酸化還元法の場合と同様に、過剰試薬の存在又は反応混合物への消耗試薬の連続的添加によ

り強い連続的発光が何時間にもわたって得られる。

【0017】 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}/+$ 再生システムはアセトニトリルのごとき有機溶媒又は部分的な水性システム中で、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を還元するに十分な負の電位と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ を酸化するに十分な正の電位との間で電極電位をパルスにすることで実施し得る。このような再生システムに適した電極としては例えばPt電極がある。このシステムは化学的試薬を消耗せず、原則として永久に作動し得る。

【0018】これら3種のRu-含有発光化合物産生法はいずれもRu-含有化合物の酸化還元又は還元酸化を繰り返して行なう。従ってこれらの化合物を含む溶液のルミネセンスは、加えられるエネルギー源の電位に大きく依存し、そのためRu-含有化合物の存在を極めて良く検出(診断)する。

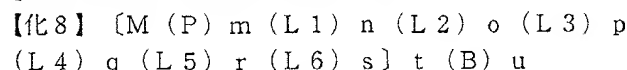
【0019】MandleはCurtis他の“Chemiluminescence; A New Method for Detecting Fluorescent Compounds Separated By Thin Layer Chromatography”, J. Chromatography 134, pp. 343-350 (1977年)をRu-トリス(ビピリジル)(II)を化学ルミネセンス用途において使用し得るラベルとして確認するものとして引用している。Curtis他はRu複合体がシュウ酸/ H_2O_2 システムにより化学的に励起されると光を発するようになり得るという非公開意見を報告しているに過ぎない(Curtis他p. 350)。MandleもCurtisも化学ルミネセンス用途におけるルテニウム及びオスミウム複合体の例外的有用性、又は電気化学ルミネセンスシステムの有用性は認めなかった。Sprintschnik, G. 他“Preparation and Photochemical Reactivity of Surfactant Ruthenium(II) Complexes in Monolayer Assemblies and at Water-Split Interfaces”, J. Am. Chem. Soc. 99, pp. 4947-4954 (1977年)にはオクタデカノール又はデヒドロコレステロールでエステル化したトリス(2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)が記載されており、これら界面活性複合体の単層フィルム形成法が開示されている。これら複合体はホトルミネセンス性であった。しかしながら、このフィルムを水に曝し次いで光に曝すとRu-複合体はホトルミネセンスを発生しなかった。その原因は光の存在下におけるエステル基の光加水分解にあった。

【0020】本出願人は広範囲のアナライトと当該アナライトに結合する化学種(moieties)とがRu-含有又はOs-含有ラベルにアミド結合又はアミン結合を介して適切に結合されることを発見した。本明細書

はこれを開示する。これらのラベルされた物質は広範囲にわたる任意の手段によって検出（決定）し得るが、現在のところ最も有効で信頼できる高感度手段はホトルミネセンス、化学ルミネセンス及び電気化学ルミネセンス手段である。本明細書では、Ru-含有及びOs-含有ラベルとルブレン及び9, 10-ジフェニルアントラセンのごとき有機分子とを含む電気化学ルミネセンスラベルが特に多目的に使用し得、有利であることも開示する。以下にこれら新規のラベルされた物質の使用と、これら物質の検出法との大きな利点を説明する。

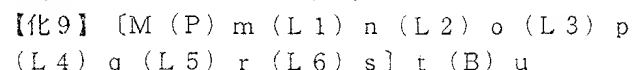
【0021】

【発明の要約】本発明によれば、式



〔式中、Mはルテニウム又はオスミウム；PはMの多座配位（polydentate）リガンド；L1、L2、L3、L4、L5及びL6はMのリガンドであり、各々が別のリガンドと互いに同じでもよく異なるものでもよい；Bは1つ以上のアミド又はアミン結合によってP、L1、L2、L3、L4、L5、又はL6の1つ以上に共有結合した物質；mは1以上の整数；n、o、p、q、r及びsの各々は0又は整数；tは1以上の整数；uは1以上の整数；P、L1、L2、L3、L4、L5、L6及びBは化学種（chemical moiety）が電磁放射線（電磁波）を放出すべく誘導されるような組成と数とを有しており、MのリガンドによってMに与えられる結合の総数がMの配位数に等しい〕で示される化学種が提供される。本発明は特に、発光ルテニウム-又はオスミウム-含有ラベルを化学物質、生化学物質及び生物物質のアミノ基に結合するための中間体（介在物）として適当な化合物を提供する。従ってこれら中間体は本発明の化学種の生成に特に適している。中間体は、ルテニウム-又はオスミウム-ビス（2, 2'-ビビリジン）（2, 2'-ビビリジン-4, 4'-ジカルボン酸）のモノ-及びジ-N-ヒドロキシスクシニミドエステル及びその塩、並びにルテニウム-又はオスミウム-ビス（2, 2'-ビビリジン）（4, 4'-ジ（クロロメチル）-2, 2'-ビビリジン）である。これら化合物は当業者に公知の手段で合成され得る。

【0022】本発明は、新規な化学種の存在の判定方法を提供する。本発明はまた、式



〔式中、Mはルテニウム又はオスミウム；PはMの多座配位リガンド；L1、L2、L3、L4、L5及びL6はMのリガンドであり、各々が別のリガンドと互いに同じでもよく異なるものでもよい；BはMのリガンド物質であるか又はP、L1、L2、L3、L4、L5、又はL6の1つ以上に結合した物質；mは1以上の整数；n、o、p、q、r及びsの各々は0又は整数；tは1

以上の整数；uは1以上の整数；P、L1、L2、L3、L4、L5、L6及びBは化学種が電磁放射線を放出すべく誘導されるような組成と数とを有しており、MのリガンドによってMに与えられる結合の総数がMの配位数に等しい〕で示される化学種の存在の判定方法を提供する。

【0023】本発明方法は、

- a) 適当な条件下で化学種を含有する反応混合物（reagent mixture）を形成させ、
- b) 反応混合物を化学エネルギー又は電気化学エネルギーに曝露して化学種からの電磁放射線の放出を誘導し、
- c) 放出された電磁放射線を検出しこれにより化学種の存在を判定するステップを含む。

【0024】本発明は更に、対象物質の存在を判定する結合方法においてルテニウム含有又はオスミウム含有ラベルの使用を提案する。これらの方法は、ラベルされた対象化学種を判定するため、ラベルされた化学種を使用して対象分析物を判定するため、ラベルされた対象分析物の類似体を使用して競合結合アッセイで対象分析物を判定するため、等に使用され得る。これら結合方法は均一又は不均一結合方法のいずれでもよい。

【0025】更に本発明は、本発明のルテニウム含有又はオスミウム含有化学種の存在を判定するためのシステムを提供する。本発明のシステムは化学種からの電磁放射線の放出を誘導する手段と放出された電磁放射線を検出する手段とを含む。本発明は更に、対象分析物判定用の結合方法にルテニウム含有又はオスミウム含有化学種を使用するためのシステムを提供する。本発明によれば、式



〔式中、Aは電気化学エネルギー源に直接曝露されて電磁放射線を反復的に放出すべく誘導され得る化合物；BはAに結合した物質；kは1以上の整数；uは1以上の整数〕で示される化学種の存在を判定するために、

- a) 適当な条件下で化学種を含有する反応混合物を形成し、
- b) 化学種を電気化学エネルギーに直接曝露して化学種からの電磁放射線の反復的放出を誘導し、
- c) 放出された電磁放射線を検出しこれにより化学種の存在を判定するステップを含む方法を提供する。

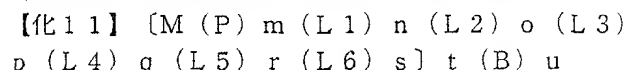
【0026】本発明は更に、対象物質の存在を判定するための結合方法における電気化学ルミネセンス性ラベルの使用を提案する。これらの方法はラベルされた対象化学種を判定するため、ラベルされた化学種を使用して対象分析物を判定するため、ラベルされた対象分析物の類似体を使用して競合結合アッセイで対象分析物を判定するため、等に使用され得る。これら結合方法は均一又は不均一結合方法のいずれでもよい。

【0027】本発明の特定具体例では、異なる2種以上の化学種を含有する組成物が提供される。化学種の各々

は異なる波長の電磁放射線を放出すべく誘導され得る化学物質種 (chemical species) でもよい。本発明の別の具体例では、化学種は、各々が異なる値のエネルギー又は異なるエネルギー源からのエネルギーに曝露されて電磁放射線を放出すべく誘導されるような複数の化学物質種から成ってもよい。この場合、別の対象物質又は分析物が異なる化学種の各々に特異的に結合し得る。これらの組成物及び方法の使用によって、被験サンプル中に存在する異なる2種以上の対象物質又は分析物を判定することが可能である。

【0028】

【本発明の詳細な説明】本発明によれば、式、



〔式中、Mはルテニウム又はオスミウム；PはMの多座配位リガンド；L1、L2、L3、L4、L5及びL6はMのリガンドであり各々が別のリガンドと互いに同じでもよく異なるものでもよい；Bは1つ以上のアミド又はアミン結合によってP、L1、L2、L3、L4、L5、又はL6の1つ以上に共有結合した物質；mは1以上の整数；n、o、p、q、r及びsの各々は0又は整数；tは1以上の整数；uは1以上の整数；P、L1、L2、L3、L4、L5、L6及びBは化学種が電磁放射線を放出すべく誘導され得るような組成と数とを有しており、MのリガンドによってMに与えられる結合の総数がMの配位数に等しい〕で示される化学種が提供される。

【0029】この化学種は、1種類以上のMの多座配位リガンドを有していなければならない。この化学種が2つ以上の多座配位リガンドを有するとき複数の多座配位リガンドは互いに同じでもよく異なっているもよい。多座配位リガンドは芳香族及び脂肪族リガンドを含む。適当な芳香族多座配位リガンドは芳香族複素環リガンドを含む。好ましい芳香族複素環リガンドは窒素含有リガンド例えば、ピピリジル、ピピラジル、テルピリジル及びフェナントロリルである。

【0030】適当な多座配位リガンドは未置換でもよく、又は当業者に公知の多数の置換基のいずれかによって置換されていてもよい。適当な置換基の例は、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、カルボキシレート、カルボキシアルデヒド、カルボキシアミド、シアノ、アミノ、ヒドロキシ、イミノ、ヒドロキシカルボニル、アミノカルボニル、アミジン、グアニジニウム、ウレイド、硫黄含有基、燐含有基及びN-ヒドロキシスクシンイミドのカルボン酸エステルである。

【0031】この化学種は1種類以上の単座配位 (monodentate) リガンドを有しているもよい。多数の単座配位リガンドが当業者に公知である。適当な単座配位リガンドは例えば、一酸化炭素、シアニド (シア

ン化物)、イソシアニド、ハロゲン化物、並びに、脂肪族、芳香族及び複素環ホスフィン、アミン、スチベン、アルシンである。

【0032】本発明の化学種のとくに好ましい具体例は、ビス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム (II) 及びトリス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム (II) である。

【0033】付加的化学ラベル例えば放射性同位体、蛍光成分又は付加的発光ルテニウムもしくはオスミウム含有中心に結合されるべき1種類以上のMのリガンドは本発明の範囲内に包含される。更に、2つ以上又は多数の電気化学ルミネセンス性中心によってラベルされるべきラベル物質 (B) も本発明の範囲内に包含される。

【0034】適当な物質 (B) としては多くの生物物質、例えば全細胞、ウイルス、細胞下粒子、タンパク質、リボタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、核酸、多糖類、リポ多糖類、細胞代謝物、ホルモン、薬理物質、トランスクライザー、バルビツール酸エステル、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸及び糖類がある。全細胞は動物又は植物又は細菌のいずれでもよく、生細胞でも死細胞でもよい。例えば植物病原体例えば菌類又は線虫類がある。「細胞下粒子」なる用語は、例えば、細胞下小器官、破壊細胞の膜粒子、細胞壁の断片、リボソーム、多酵素複合体及びその他の生体由来の粒子を包含する。核酸は例えば、様々な由来の染色体DNA、プラスミドDNA、ウイルスDNA、及び組換え体DNAを含む。核酸はまた、RNA例えば、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、転移RNAを含む。ポリペプチドは例えば、酵素、輸送タンパク質、受容体タンパク質、及び構造タンパク質例えばウイルスコートタンパク質を含む。好ましいポリペプチドは酵素及び抗体である。特に好ましいポリペプチドはモノクローナル抗体である。ホルモンは例えばインシュリン及びT4甲状腺ホルモンを含む。薬理物質 (薬理剤) は例えば、強心配糖体を含む。生物物質に化学的に類似した合成物質例えば合成ポリペプチド、合成核酸、合成膜、小胞及びリボソームも勿論本発明の範囲内に包含される。これらは全て本発明での使用に適した生物物質の判り易い例として示しただけであり、本発明の範囲はこれらの物質に限定はされない。

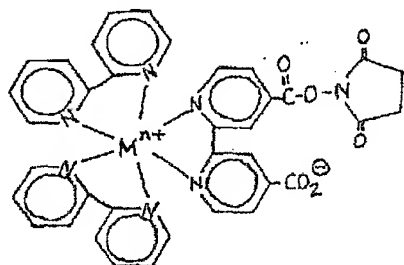
【0035】ラベルされた重合物質の如き非生物物質も本発明の範囲内に含まれる。これらの物質は可溶重合分子の形態でもよく、又は、公知の種々の巨視形態のいずれか例えばビーズ等でもよく、又は、試験管、瓶もしくはアッセイウェル等の如き容器でもよい。生物物質及び非生物物質 (B) はアミド又はアミン結合を介してMのリガンドに共有結合する。アミド結合の場合、結合は、物質 (B) がアミド結合のカルボニル又は窒素に直接結合するように配向される。これらの化学種はイオン化されていてもよい。その場合、異なる多くの対イオンが化

学種調整物の電荷を中和し得ることは当業者に明らかであろう。適当なカチオンは例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、グアニジニウム、 Ag^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} である。適当なアニオンは例えば、ハロゲン化物、 OH^- 、炭酸塩、 SO_4^{2-} 、ヘキサフルオロホスフェート及びテトラフルオロボレートである。

【0036】本発明は更に、ルテニウム含有又はオスミウム含有の発光ラベルを化学物質、生化学物質及び生物物質のアミノ基に結合させる中間体（介在物）として特に適した化合物を提供する。従ってこれら中間体は本発明の化学種の合成に特に適している。本発明の中間体はルテニウム又はオスミウムのビス（2，2'-ビピリジン）（2，2'-ビピリジン-4，4'-ジカルボン酸）のモノ-及びジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル及びその塩並びにルテニウム又はオスミウムビス（2，2'-ビピリジン）（4，4'-ジ（クロロメチル）-2，2'-ビピリジン）である。

【0037】これら中間体は以下の化学構造を有する。ルテニウム又はオスミウムのビス（2，2'-ビピリジン）（2，2'-ビピリジン-4，4'-ジカルボン酸）のモノ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルは、

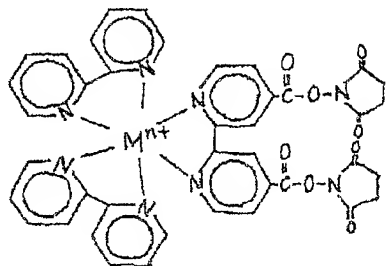
【化12】



〔式中、MはRu又はOs、nは整数1、2又は3〕又はその塩及びその立体異性体を含む。

【0038】ルテニウム又はオスミウムビス（2，2'-ビピリジン）（2，2'-ビピリジン-4，4'-ジカルボン酸）のジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルは、

【化13】

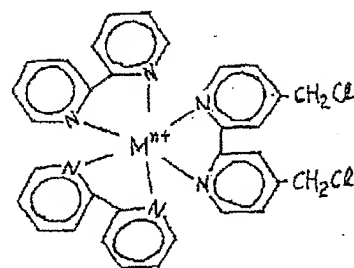


〔式中、MはRu又はOs、nは整数1、2又は3〕又はその塩及びその立体異性体を含む。

【0039】ルテニウム又はオスミウムビス（2，

2'-ビピリジン）4，4'-ジ（クロロメチル）-2，2'-ビピリジン）は、

【化14】



〔式中、MはRu又はOs、nは整数1、2又は3〕及びその塩及びその立体異性体を含む。これら化合物は当業者に公知の手段で合成され得る。

【0040】ルテニウム含有N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの好ましい合成方法によれば、先ず炭酸水素ナトリウムの高温メタノール水溶液中でルテニウムジクロロビス2，2'-ビピリジンを2，2'-ビピリジン-4，4'-ジカルボン酸と反応させる。酸性化した後にカルボキシル化したルテニウム化合物の溶液にNaPF₆の水溶液を添加する。単離したルテニウム錯体のヘキサフルオロホスフェート塩を次に、ジメチルホルムアミド中のジシクロヘキシルカルボジイミドの存在中でN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させてエステル化する。本発明の中間体の効果を実質的に悪化させずにN-ヒドロキシスクシンイミド成分の構造について多くの変形が可能である。これら中間体はイオン化されてもよい。その場合、異なる多くの対イオンが中間体調整物の電荷を中和し得ることは当業者に明らかであろう。適当なカチオンは例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、グアニジニウム、 Ag^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} である。適当なアニオンは例えばハロゲン化物、炭酸塩、 SO_4^{2-} 、ヘキサフルオロホスフェート及びテトラフルオロボレートである。

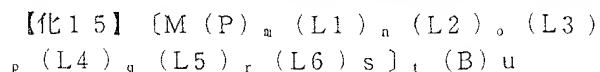
【0041】これら中間体は、カルボン酸エステルを攻撃してN-ヒドロキシスクシンイミドを置換し得るか又はクロロメチル基を攻撃して塩化物を置換し得る遊離アミノ基を含有する物質をラベルするために有効である。対象分析物をラベルするためには従来技術のイソチオシアネート（例えばWeber、米国特許第4，293，310号）よりも本発明の中間体のほうが好ましい。イソチオシアネートは一般に、二硫化炭素又はチオホスゲンと第一級アミンとの反応によって調製されるが、二硫化炭素及びチオホスゲンはいずれも揮発性であり極めて有毒である。二硫化炭素はまた、引火爆発の危険がある。また必要な前駆物質たる芳香族第一級アミンは本発明で使用される前駆物質たる芳香族カルボン酸よりも入手が難しい。また、本発明の中間体はイソチオシアネート誘導体よりも反応しにくく従って保存及び取り扱いが容易である。

【0042】本発明は更に、本発明の化学種の存在を判定する方法を提供する。金属含有組成物は、当業者に公知の種々の手段例えば放出（エミッション）、吸収、蛍光スペクトル測定、原子吸収、陽極ストリッピング電圧測定、中性子活性化及び電気化学的方法の如き手段によって検出され得る。ホトルミネセンス、ケミルミネセンス及び電気化学ルミネセンスの方法が特に重要である。ルミネセンスの技術を使用すると $Ru(bpy)_3^{2+}$ が極めて低濃度でも測定できる。酸化的還元法を用いると（Ege等（1984）、Analytical Chemistry、印刷中）、 $5 \times 10^{-8} M$ の $Ru(bpy)_3^{2+}$ の検出が可能であった。これらの実験では、燐酸バッファ pH 5.0 中に 1 mM のシュウ酸ナトリウムを用い、飽和塩化ナトリウム参照電極に対して電位を +1.0 V ~ +1.4 V で 5 ~ 10 秒間隔のパルスにした。還元的酸化法ではより高い感度が得られることも知見された。 $CH_3CN:H_2O$ （1:1 容量/容量）中の 18 mM の $Na_2S_2O_8$ と 0.1 M のテトラ-n-ブチルアンモニウムテトラフルオロボレートとを使用すると $10^{-13} M$ という低い濃度の $Ru(bpy)_3^{2+}$ が検出できた。方法を更に精密にすれば更に高い感度が期待できる。これらの方法はまた、ラベルされた物質の敏感で正確な測定値を与える。これに関しては後出の実施例で十分に説明する。

【0043】 $Ru(bpy)_3^{2+}$ でラベルした物質に関する本出願人等の実験によって、ルテニウム含有及びオスミウム含有化合物の化学ラベルとしての利点が証明された。これらの化合物は長期安定性であり、種々の化学物質、生化学物質及び生物物質に有効に結合し得る。ラベルは安全で比較的安価である。

【0044】それらは極めて特徴的なシグナルを与え、自然には生起しないものである。標識の発光に基づく測定は高感度、迅速且つ再現性があり、簡単な装置を利用するものである。これらの標識の発光に基づく検出はリン酸緩衝溶液、トウィーン™（界面活性剤）、肝臓組織抽出物又は血清のような成分のよっては殆んど干渉されることはない。これら標識の発光に基づく測定は試料又は標識物質を破壊することなく繰返し行うことができる。各標識分子によりシグナルが繰返し発せられ、それによって、これら標識を検出し得るだけに感度が増強される。特定用途の必要に応じて、標識物質の存在は定量的又は定性的に測定することができる。注意事項：「測定」という用語は本明細書に於いて標識物質の定量的又は定性的測定の意味に用いる。

【0045】従って、本発明は次式を有する化学種：



〔式中、Mはルテニウムまたはオスミウムであり、PはMの多座配位リガンドであり、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 および L^6 はMのリガンドであって各々同一

でもまたは互いに他のリガンドと異なってもよく、BはMのリガンドである物質であるかまたはP、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 もしくは L^6 の1個以上に結合している物質であり、mは1以上の整数であり、n、o、p、q、r および s の各々はゼロまたは整数であり、tは1以上の整数であり、uは1以上の整数であり、P、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 および B は電磁放射線を放出させるべくこの化学種を誘導できるような組成と数になっており、MのリガンドとMとの結合の総数はMの配置数に等しい〕の存在を測定するための方法であって、

【0046】a) 適切な条件下で前記化学種を含有する試薬混合物を形成し、

b) この試薬混合物を化学エネルギーまたは電気化学エネルギーに曝露することによって化学種を誘導して電磁放射線を放出させ、

c) 放出された電磁放射線を検出することにより対象分析物の存在を測定することからなる方法を提供するものである。

【0047】本発明方法で使用し得る化学種中に、生物由来の又はそうでない物質（B）はMへの直接の配位によって、又はMのリガンドに結合することで該種に取り込まれ得るものである。結合は共有結合、静電気結合又は水素結合によってなされ得るものである。物質（B）をMのリガンドに共有結合させ得る手段は多様である。例えば、上記結合はアミドあるいはアミン結合、エステルあるいはチオエステル結合、エーテルあるいはチオエーテル結合又は当業者に公知の多数の他の手段のうちのいかなるものでも良い。結合の型はリガンドの置換基及び標識されることになっている物質上にあるリガンドとの結合に用い得る適当な化学基によって決定されることになる。適当な物質（B）には、例えば、細胞全体、細胞レベル下の粒子、核酸、多糖、タンパク、糖タンパク、リポタンパク、リポ多糖、ポリペプチド、細胞代謝物質、ホルモン、薬理剤、鎮静剤（トランキライザー）、精神安定剤（バルビツエート）、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖及び生物由来でないポリマーがある。本発明の好適具体例では、結合はアミド又はアミン結合である。アミド又はアミン結合はリガンド上の置換基及び標識されることになっている物質上のアミノ基との間で形成される。

【0048】本発明方法は相補的物質と特異的複合体（コンプレックス）を形成することによって化学種を測定する方法を含むものである。特に興味があるのは、抗原-抗体の一对の物質についてである。この結合方法は、例えば、血液、尿又は合成反応混合物のような複合体混合物中のジゴキシン又はジギトキシンのような標識抗原の存在を、まず初めに対象抗原に特異的な固定化抗体に該混合物を接触させ、その後該固定化抗体に結合した標識物質の量を測ることによって測定する為に使用する

ることができる。

【0049】「誘導して電磁放射線を放出させる」という語句は該化学種の励起状態を作り出すことを意味し、これは室温にて200nm～900nmの波長の発光を行なうものである。本発明はオスミウム含有種及びルテニウム含有種に関するものであり、リガンドの化学構造を変化させることによって得られる広範囲に亘る様々な発光種を含有するものである。これらの金属及びリガンドが変化することにより、それら発光種が励起状態になる為に必要とされるエネルギー入力 of 正確な値が変り得る。これと同様に、電磁放射線の放出波長はルテニウム又はオスミウム含有物質の性質及び環境によって変化し得るものである。一般に、ホトルミネセンスに於ける励起及び発光は約200nm～約900nmの波長の電磁放射線を伴って生起するものである。化学発光及び電気化学発光に於ける放出は一般に約200nm～約900nmの波長の電磁放射線の放出を伴って生起するものである。化学種の酸化・還元が起るポテンシャルは使用する電極の性質及び溶液のpHのような因子と同様にまさにその化学構造に左右されるものである。一般に、ホトルミネセンスシステムに於ける励起及び放出の最適波長及び化学発光又は電気化学発光システムの最適ポテンシャル及び最適放出波長の測定方法は当業者には周知のことである。

【0050】存在する発光種を定量する方法は多数あるということは明らかである。システムへのエネルギー入力の速度によって発光種を測定することができる。適当な測定としては、例えば、発光種が電気化学的に生成される際の電流測定、化学的に発光種を生成する際の還元剤あるいは酸化剤の使用速度又はホトルミネセンス法に於ける電磁エネルギーの吸収速度の測定が挙げられる。更に当然のことながら、放出される電磁放射線を測定することによっても、発光種を検出することができる。これら測定は全て、速度に基づく連続的な測定、又は長時間に亘りシグナルを累積する累積法のいずれかの方法として実施し得る。速度に基づく測定の例としては、入射光強度に比例した量の電流を生じる、光電子増倍管チューブ、光ダイオード又は光トランジスターを用いるものがある。累積法の例としては、速度に基づいて得られたデータの積分、及び直接に累積データを与える写真フィルムを用いるものがある。

【0051】これら全ての発光に基づく方法には、ルテニウム含有化合物による発光の繰返しが必然的に伴っている。検出し得る事象が繰返し起るといふこれらの標識の持つ性質は、放射性同位体又はルミノールのような結合化学発光分子とは明確に異なるものである。後者の標識はその分子（又は原子）1個につきただの1回しか検出し得る事象を生起せず、その為にこれら標識の検出可能性は制限される。

【0052】本発明は更に、ルテニウム及びオスミウム

含有標識を対象分析物の存在を測定する為の結合方法に使用することを提供するものである。このような結合方法は当業者には数多く知られている。これらの方法はしばしば、生化学的及び生物的成分が互いに結合する際の高度な特異性を利用するものである。その例としては、核酸ハイブリダイゼーション法に基づく方法、抗原-抗体に基づく方法及び酵素-リガンドに基づく方法がある。これらの方法では、対象分析物を測定する為に標識種を用いるか又は競合結合アッセイに於いては対象分析物を測定する為に対象分析物の標識類似体を使用する為に標識種を用いることができる。対象分析物及び化学種は特異的な様式でお互いに結合し得る物質の対であればどのようなものでもかまわない。このような物質としては、例えば、細胞全体、細胞レベル下の粒子、核酸、多糖、タンパク、糖タンパク、リボタンパク、リボ多糖、ポリペプチド、細胞代謝物質、ホルモン、薬理剤、鎮静剤、精神安定剤、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖及び生物由来でないポリマーがある。

【0053】特に興味があるのは、抗原-抗体対である。例えばこの方法には細胞表面抗原の存在を測定する為に標識抗体を使用すること、又は細胞選別法による検出の為に或る特定の細胞を標識することが含まれる。例えば固定化された非標識抗体に結合することによって固定化された抗原は一般に「サンドイッチ法」として公知の方法に於いて標識抗体によって検出することができる。

【0054】競合結合アッセイに於いては、対象分析物及び該分析物の標識類似体は、例えば、細胞全体、細胞レベル下の粒子、核酸、多糖、タンパク、糖タンパク、リボタンパク、リボ多糖、ポリペプチド、細胞代謝物質、ホルモン、薬理剤、鎮静剤、精神安定剤、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖及び生物由来でないポリマーのような相補的物質との特異的複合体の形成に関与することのできる物質であればどのような物質でもかまわない。特に興味があるのは抗原-抗体に基づく方法である。この方法は、対象分析物がその分析物の標識類似体を抗体から追い出したときにその分析物を検出する、ラジオイムノアッセイと呼ばれる周知のものに類似している。当業者に公知のラジオイムノアッセイの様々な変法は、放射活性標識された化合物の代りに本発明の標識化学種を用いることによって原理的には有利に使用することができる。

【0055】本発明は更にホモジナス又はヘテロジナスな結合方法に於いて標識化学種を使用することを提供するものである。ヘテロジナス結合方法に於いては、標識の存在を測定する前に未結合標識物質から結合標識物質を物理的に分離しなければならない。これは抗原-抗体システムに於いてしばしば、例えば抗体という一成分を、フィルターのような不溶マトリックスか又はテストチューブのような反応容器或いはビーズの表面に

結合させて固定化することにより達成される。抗原含有溶液をフィルターを通すか又は反応容器に注ぎ、その後それをフィルター又は反応容器側部から洗滌除去する。抗体に特異的に結合した抗原のみが残留し測定されることになる。

【0056】これと対照的にホモジナス方法に於いては、標識の存在を測定するときに結合及び未結合の標識物質が同一反応混合物中に存在する。これは標識からの検知可能なシグナルの特性が結合によって修飾されるときに可能となる。発光標識をホモジナスシステムで使用するのことができるような多数の方法がある。例えば、もし発光消光剤が抗体上に適切に配置されているならば、標識抗原が結合することによって該抗体上の発光消光剤が標識の発光を抑制する。発光標識を用いる多数のホモジナス方法が当業者に公知であり、そのうちの幾つかはBoguslaski及びLi(1982)著の「ホモジナスイムノアッセイ」、Applied Biochemistry and Biotechnology 7, 401-414頁中で検討されている。

【0057】本発明によって独特で有効なタイプの均質結合アッセイが提供される。本文中の記載によれば、これらのラベルは、ラベルされた対象物質の溶液を電極に接触させることによって電気化学的に測定され得る。溶液中に存在するが電極の表面に接近できないラベル物質は検出されないであろう。検出されない場合として例えば、ラベル物質が電極を収容した反応容器の表面に直接又は間接に結合しているとき、又は、ラベルが特異的複合体例えば抗原抗体複合体の内部深くに包埋されているとき、又は、電極自体がラベル物質を通過させるが錯体を形成したラベル物質を通過させない層で被覆されているときがある。更に、電極の表面が抗体で被覆されることもあり、この場合、固定化抗体に結合したラベル抗原だけが電極に接近でき従って測定され得る。所望の電極電位が短いパルスで与えられるときはこの特別な均質法が最も有効であろう。

【0058】ラベル化合物の存在を測定する手段の組み合わせ使用も本発明の範囲内に包含される。例えば、ホトルミネセンス又はケミルミネセンスの如き結合ラベル物質と未結合ラベル物質とを識別しない手段によってラベル物質の総量を測定し、例えば電気化学ルミネセンスの如き結合ラベル物質と未結合ラベル物質とを識別する手段によって結合ラベル物質の量を測定するのが好ましい。かかる組み合わせ方法は同じサンプルに実施することができ、従って方法が個々に使用される場合よりもサンプルに関して多くの情報が得られる。更に、本発明の範囲内で同じ反応混合物中の異なる2種以上のラベル化合物の存在を測定することも可能である。このような方法は、異なるラベルが異なる波長の電磁放射線を放出するとき、又は、ラベルが異なる値又は異なるエネルギー源のエネルギーに曝露されることによって電磁放射線を放出

すべく誘導され得るときに可能である。本発明は更に、ルテニウム含有又はオスミウム含有化学種の存在を測定(判定、決定)するシステムを提供する。該システムは、化学種を含有する反応混合物(試薬混合物)と電磁放射線を放出せしむべく化学種を誘導する手段と、放出された電磁放射線を検出する手段とを含む。

【0059】本発明は更に、対象分析物を測定するためにルテニウム含有又はオスミウム含有のラベル化学種を使用するシステムを提供する。本発明のシステムは、本明細書に開示され且つ教示された種々の方法の迅速、有効且つ柔軟な実行に有用である。本発明は更に、式

(A) $k(B)_n$ で示される化学種の存在の測定方法を提供する。Aは電気化学エネルギー源に直接曝露されて電磁放射線を反復的に放出するように誘導され得る化合物である。これら化合物は、無機、有機金属又は有機化合物のいずれでもよく、例えばルプレニ、9, 10-ジフェニルアントラセン、又はルテニウム含有もしくはオスミウム含有ラベルである。BはAに結合した物質であり、kは1以上の整数であり、nは1以上の整数である。

【0060】該方法によれば、適当な条件下で化学種を含有する反応(試薬)混合物を形成し、化学種を電気化学エネルギーに直接曝露することによって電磁放射線を反復的に放出せしむべく誘導する。放出された電磁放射線は適当な方法によって検出されこれによって化学種の存在を測定し得る。生物又は非生物物質(B)はAに対する任意の結合形態によって化学種に組み込まれることが可能である。結合は、A中に存在する金属原子又はAのリガンドに対する配位によって行なわれる。結合は、共有結合、静電結合又は水素結合でもよい。結合のタイプは、AとBとの双方の結合に使用し得る適当な化学基によって決定されるであろう。

【0061】適当な物質(B)は例えば、全細胞、細胞下粒子、核酸、多糖類、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、リポ多糖類、ポリペプチド、細胞代謝物、ホルモン、薬理物質、トランキライザー、バルビツール酸エステル、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸及び糖である。物質は生物物質に限定されない。ポリマー、有機又は無機の化合物の如き任意の適当な非生物物質でもよい。

【0062】化学種は、室温で約200ナノメートル〜約900ナノメートルの波長で発光する化学種の励起状態を生起することによって電磁放射線を放出すべく誘導される。本発明のこの具体例において、化学種は反応(試薬)混合物を電気化学エネルギーに曝露することによって励起される。本発明の化学種の還元又は酸化が生じる電位は、該化学種の正確な化学構造と溶液のpH及び使用電極の種類の如き要因とに依存する。電気化学ルミネセンスシステムの最適電位と放出波長との決定方法は当業者に公知である。電気化学発光性の化学種を測定する

には、電流又は放出電磁放射線の測定の如き任意の適当な方法を用いる。また、本発明の化学種の存在の測定方法を化学種が別の化学物質と結合できる場合に利用することも可能である。化学物質は化学種に特異的に結合し得る任意の物質でよい。かかる方法の例として核酸ハイブリダイゼーション方法、抗体-抗原に基づく方法及び酵素-リガンド方法がある。

【0063】本発明の別の具体例によれば、電気化学発光性の化学種 (A) k (B) u が、該化学種に結合する対象分析物の存在を測定するために使用され得る。対象分析物は、電気化学発光性の化学種に結合し得るいかなる物質でもよい。例えば電気化学発光性の化学種でラベルされた抗体に結合し得る抗原でもよい。方法は、反応 (試薬) 混合物を形成させるに適した条件下で分析物を化学種と接触させるステップを含む。次に化学種を電気化学エネルギーに直接曝露することによって電磁放射線の反復的放出を誘導する。分析物に結合した化学種によって放出された電磁放射線を検出することによって分析物の存在を測定 (判定) する。

【0064】また、対象分析物の存在を測定するために競合結合方法を使用することも可能である。分析物と化学種 (A) k (B) u とは化学物質に競合的に結合する。反応混合物を形成させるに適した条件下で化学物質を化学種と分析物とに接触させる。次に化学種を電気化学エネルギーに直接曝露することによって電磁放射線の反復的放出を誘導する。電磁放射線の放出量を検出することによって対象分析物の存在を測定 (判定) する。

【0065】本発明は更に、本発明のルテニウム含有又はオスミウム含有化学種と異なる波長の電磁放射線を放出すべく誘導され得る 1 種類以上の別の化学種とを含む組成物に係る。これら組成物は同じ物質と別の物質との混合物に含有される異なる 2 種類以上の対象物質又は分析物を検出する方法及びシステムにおいて有効である。別の 1 種類以上の化学種は、電磁放射線を放出すべく誘導され得る無機、有機及び有機金属化合物の如き任意の適当な化学種、例えばルブレン又は 9, 10-ジフェニルアントラセンである。これらの化学種は、ルテニウム含有又はオスミウム含有化学種から電磁放射線を誘導するために使用されるエネルギーとは異なる値を持つか又は異なるエネルギー源からでるエネルギーに曝露されるときに電磁放射線を放出すべく誘導されるような化学種である。本発明の特定具体例において、別の化学種の各々は、ルテニウム含有又はオスミウム含有化学種の電磁放射線の放出を誘導するエネルギーと同じ値及び同じエネルギー源のエネルギーによって電磁放射線の放出を誘導されると別の異なる波長の電磁放射線を放出する。

【0066】これら化学種の測定方法では、適当な条件下で化学種を含有する反応 (試薬) 混合物を形成させ、次に反応混合物を化学エネルギー又は電気化学エネルギーに曝露して化学種の電磁放射線放出を誘導する。化学種の

各々によって放出される別々の波長の電磁放射線を検出することによって各化学種の存在が決定される。本発明は更に、同一混合物中に存在する異なる化学種に選択的に結合する 1 種類以上の対象分析物の存在を測定する方法に係る。方法は、反応 (試薬) 混合物を形成させる適当な条件下で分析物と化学種とを接触させる。反応混合物を化学エネルギー又は電気化学エネルギーに曝露することによって化学種を電磁放射線を放出すべく誘導し、放出された異なる波長の電磁放射線を検出して対象分析物の各々の存在を決定する。

【0067】混合物中の 2 種類以上の化学種の存在を測定するこれらの方法は、ルテニウム含有及びオスミウム含有の発光ラベルを測定するための前記の全てのケースに適用できる。しかし乍ら、かかる具体例では同一サンプル中に同時に存在する 2 種類以上の異なる物質を測定し得る。本発明の別の具体例によれば、別々の化学種は、別々の値又は別々のエネルギー源のエネルギーに曝露されて電磁放射線を放出すべく誘導される。これらの別々の化学種の測定方法は誘導ステップ以外は、異なる波長の電磁放射線を放出する化学種の測定方法と本質的に同じである。これら化学種は、異なる値又はエネルギー源のエネルギーによって電磁放射線を放出すべく誘導される。化学種含有サンプルが異なる時間に別々の値又はエネルギー源のエネルギーの各々に曝露され、特定の化学種によって放出された電磁放射線が検出され、これにより化学種の存在が決定される。方法はまた、サンプル中に存在する別々の化学種に選択的に結合する対象分析物の存在を決定するためにも有効である。

【0068】本発明の別の具体例では、同一サンプル中に存在する 1 種類以上の式 (A) k (B) u をもつ電気化学発光性の化学種を測定する方法及びシステムを含む。これら化学種は、電気化学エネルギー源に曝露されると異なる波長の電磁放射線を放出する化合物又は各々が別々の電気化学エネルギー源に曝露されて電磁放射線を放出すべく誘導され得る複数の異なる化合物を含有する。これら複数の異なる電気化学発光性の化学種は別々の対象物質又は分析物に特異的に結合し得る。異なる化学種の測定は前記と同じ手順で行なわれる。本発明を実施例に基づいて以下に説明する。これらの実施例は本発明を理解し易くするための非限定例であり、本発明の範囲は請求の範囲のみによって限定される。

【0069】実施例 I

ルテニウムビス (2, 2'-ビピリジン) (2, 2'-ビピリジン-4, 4'-ジカルボン酸) ビス (ヘキサフルオロホスフェート) の調製

重炭酸ナトリウム (0.40 g)、ルテニウムジクロロビス (2, 2'-ビピリジン) (0.40 g) 及び 2, 2'-ビピリジン-4, 4'-ジカルボン酸 (0.30 g) を、環流メタノール (20 ml) - 水 (5 ml) 中で 9 時間攪拌した。得られた溶液を氷浴中で冷却し、5

滴の濃 H_2SO_4 で処理し、1.5時間氷温に維持した。形成した沈殿を濾別し MeOH (8 ml)で洗浄した。炉液と洗浄液を合わせたものを水 (25 ml)中のナトリウムヘキサフルオロホスフェート (5.0 g)の溶液で処理した。得られた溶液を氷浴で3時間冷却し、赤紫色結晶の得られた沈殿を濾過により回収した (0.40 g)。

【0070】実施例II

ルテニウムビス (2, 2'-ビピリジン) (2, 2'-ビピリジン-4, 4'-ジカルボン酸)の活性エステルの調製

ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 0.046 g) 及びN-ヒドロキシスクシンイミド (0.034 g)をDMF (2 ml)中に攪拌して溶解し、氷浴中で冷却した。ルテニウムビス (2, 2'-ビピリジン) (2, 2'-ビピリジン-4, 4'-ジカルボン酸) (0.101 g、実施例Iのように調製した)をDMF (1 ml)中に溶解した溶液を加え、混合物を氷浴温度で5時間攪拌した。形成した沈殿を遠心分離した。活性化ルテニウム複合体を含む上清を、基質を標識するために保存した。

【0071】実施例III

子牛血清アルブミン (BSA)の活性化ルテニウム複合体による標識化

実施例IIで調製した活性化ルテニウム複体のDMF溶液 (1 ml)を、攪拌下の水性生理緩衝塩溶液 (PBS, 5 ml)中のBSA溶液 (25 mg/ml BSA)に加えた。混合物を1夜攪拌し、沈殿を遠心分離で除去した。ルテニウム標識BSAを含む上清を2つの方法で分析した。

【0072】方法1：透析

ルテニウム標識BSA溶液をPBS溶液で透析した。コントロールとして実施例IIで調製した非結合の活性化ルテニウム複合体もPBS溶液で透析した。8時間後、コントロールでは透析チューブ中には蛍光を有するものは見られなかった。それに対し、ルテニウム標識BSA溶液は強い蛍光を示し、ルテニウム複合体が高分子量BSAに結合したことを示した。

【0073】方法2：マイクロフィルトレーション

ルテニウム標識BSA溶液をアミコンマイクロコンセンレーター中に入れ、8000 rpmで遠心した。赤橙色溶液の小画分がフィルター上に残り、この着色画分を洗浄PBS溶液で希釈し遠心した。この手順は数回繰り返した。4回の洗浄後、フィルターを通しては無色の溶液が得られ、フィルター上には強く赤橙色に着色した物質が残った。この結果は、ルテニウム複合体が高分子量BSAに結合したことを示している。

【0074】実施例IV

ヒトイムノグロブリンG (IgG)の活性化ルテニウム複合体による標識化

実施例IIで調製した活性化ルテニウム複体のDMF溶液を攪拌下に水性バッファー中のアフィニティー精製ヒトIgG溶液に加えた。ルテニウム標識化IgG溶液は、十分に透析した後に強い蛍光を示し、ルテニウム複合体が高分子量のアフィニティー精製ヒトIgGに結合したことが示された。

【0075】実施例V

ウサギ抗サルモネラ抗体の標識化

実施例IIで調製した活性化ルテニウム複体のDMF溶液 (0.1 ml)を抗サルモネラ抗体を含むウサギ血清 (1 ml)と共に室温で1時間攪拌し、その後ジエタノールアミン (0.1 ml)を加えて停止した。ルテニウム標識抗サルモネラ抗体を含む得られた溶液でサルモネラ細胞を処理した。細胞の遠心分離及び新鮮バッファーへの再懸濁を5回繰り返す、全ての非結合抗体 (ルテニウム標識非結合抗体を含む) 及び全ての遊離ルテニウム複合体から細胞を分離した。ルテニウム標識抗サルモネラ抗体で処理したサルモネラ細胞は、蛍光光学顕微鏡で観察すると明るい赤橙色光を発しており、抗サルモネラ抗体がルテニウム複合体で標識され、ルテニウム標識抗体はルテニウム複合体が蛍光を発する条件下でサルモネラ細胞に結合する能力を保有することが示された。

【0076】実施例VI

正常マウス血清 (即ち、抗サルモネラ抗体を持たない)を抗サルモネラ抗体を含むウサギ血清の代りに使用して実施例Vの手順を繰り返した。処理後、サルモネラ細胞は蛍光光学顕微鏡で観察しても赤橙色を発しておらず、ルテニウム標識正常マウス血清成分のサルモネラ細胞に対する非特異的結合は起こらないことが示された。

【0077】実施例VII

ヤギ抗ウサギイムノグロブリン (IgG)の標識化及びローダミンとの比較

実施例IIで調製した活性化ルテニウム複体のDMF溶液を攪拌下にアフィニティー精製ヤギ抗ウサギIgG溶液に加えた。反応後、混合物をバッファーに対して透析した。透析チューブ内に残った物質はUVライト下で蛍光を発した。ルテニウム標識IgGのウサギ抗サルモネラ抗体被覆サルモネラに対する反応性をテストした。ガラス顕微鏡スライドに固定したサルモネラ・ワーシントン (*Salmonella worthington*)とウサギ抗サルモネラ抗体を反応させ、非反応抗体をバッファーで洗い流した。次にルテニウム標識ヤギ抗ウサギIgGを抗体処理サルモネラ・ワーシントンと反応させ、非反応物質をバッファーで洗い流した。このスライドを50 W水銀ランプを備えた光学顕微鏡で観察すると、非常に明るい橙赤色蛍光がバクテリア上及び周囲に見られた。ルテニウム標識抗体の非特異的結合についてコントロールの実験を行なった。ガラス顕微鏡スライドに固定したサルモネラ・ワーシントンを正常マウス血清と反応させ、その後ルテニウム標識ヤギ抗ウサギIgG

抗血清と反応させた。その後同じ洗浄工程を行なった。橙赤色蛍光は観察されなかった。比較の目的で、ローダミンイソチオシアナート結合ヤギ抗ウサギ Ig G 抗血清を（ルテニウム結合抗体と等価のタンパク質濃度で）、ウサギ抗サルモネラ抗体で被膜したサルモネラ・ワシントンと反応させた。赤色の蛍光がわずかに検出されたが、蛍光の強度はルテニウム結合体に比較して有意に小さいものであった。

【0078】実施例VIII

ルテニウム標識・子ウシ血清アルブミン (BSA) の電気化学発光 (ECL) 検知

光学的に平坦な底部を有する1区角タイプのセル (30 ml) 中で ECL 測定を行なった。測定電極はガラス炭素で、対する電極はプラチナネットとし、疑似対照電極は銀ワイヤで行なった。光強度の測定は、-2.0 V

(Ag ワイヤに対して) の電位をかけ、光増強管 (Hamamatsu 928) で発光を検知し、2つに対して得られる信号を Bascom-Turner Recorder で統合した。アセトニトリル-水 (9 ml、50:50 v/v)、テトラブチルアンモニウムテトラフルオロボレート (329 mg) 及びジアンモニウムパーオキシジスルフェート (42 mg) を ECL セル中で混合し、バックグラウンド光強度を記録した。ルテニウム標 BSA 溶液 (実施例 III で調製したもの) を、アセトニトリル-水 (50:50 v/v) 中に希釈し、該希釈 BSA 溶液 (1 ml) を ECL セル中に加えた。得られた溶液は溶媒飽和窒素気泡で脱気した。表 I はルテニウム標識 BSA の異なる濃度に対して得られた結果を示している。

【表1】

表 I

光強度 (任意単位)	(ルテニウム) M
5.2	ブランク
20.63	1×10^{-11}
33.25	1×10^{-10}
54.42	9×10^{-10}
150.2	8×10^{-9}

【0079】実施例IX

4, 4'-ージ (クロロメチル) -2, 2'-ビピリジン-ビス (2, 2'-ビピリジン) ルテニウム (II) ²⁺ の調製

Sprintschnik 等 (J. Amer. Chem. Soc. 99, 4947 (1977)) の方法により、2, 2'-ビピリジン-4, 4'-ジカルボン酸から 4, 4'-ジエトキシカルボニル-2, 2'-ビピリジンを調製した。該ジエチルエステル (100 mg) を無水ジエチルエーテル (35 ml) 中に溶解した。リチウムアルミニウムヒドリド (100 mg) を加え、30分インキュベートした後ジエチルエーテル (35 ml) 及び氷冷脱イオン水 (100 ml) を加えた。溶液をよく混合し、エーテル層を回収した。水成層はエーテル (70 ml) で2回以上抽出した。エーテル抽出物を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥し濾過した。ロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、所望生成物 (43 mg) を得た。この 43 mg の 4, 4'-ジ (ヒドロキシメチル) -2, 2'-ビピリジン及び 120 mg の cis-4, 4'-ジクロロビス (2, 2'-ビピリジン) ルテニウム (II) ジヒドレートにエタノール (25 ml) に加え、溶液を14時間環流させた。溶液を冷却した後、アンモニウムヘキサフルオロホスフェートの溶液 (水 1 ml 中 1 mg) の 50 μ l を加え、得られた結晶状固体を回収し、少量のエタノールで洗浄して乾燥し、138 mg の 4, 4'-ジヒドロキシメチル複合体のヘキサフルオロホスフェート塩を得た。この複合体 (6 mg) を塩化チオ

ニル (5 ml) に加え、溶液を6時間環流させた。蒸留により塩化チオニルを除去し、固体残渣をジオキサノン-水 (1:1) 混合物 (500 μ l) に溶解した。4, 4'-ージ (クロロメチル) -2, 2'-ビピリジン-ビス (2, 2'-ビピリジン) ルテニウム (II) ²⁺ を含むこの溶液を抗体の標識に使用した。

【0080】実施例X

4, 4'-ージ (クロロメチル) -2, 2'-ビピリジン-ビス (2, 2'-ビピリジン) ルテニウム (II) ²⁺ によるウサギ及びヒツジ抗マウス Ig G の標識化

ウサギ及びヒツジ抗体を PBS 中の 2 mg/ml の溶液とした。これ等の溶液を重炭酸ナトリウム (500 ml、50 mM、pH 9) に対して一晩透析した。その後抗体 (2 mg) を重炭酸ナトリウム溶液で希釈し 2 ml の最終容量とした。この溶液 (1 ml) を炭酸ナトリウム溶液 (1 ml、50 mM) に加え pH を 10 に調整した。ジオキサノン-水中の活性化複合体溶液 (100 μ l) を抗体溶液に加え 4℃ で 16 時間反応させた。この後、反応物に BSA (5 mg) を加え、溶液を直ちに炭酸バッファー (500 ml、25 mM、pH 9) に対して透析した。透析バッファーは 24 時間間隔で3回交換した。

【0081】実施例XI

蛍光光度測定分析による標識ウサギ及びヒツジ抗マウスイムノグロブリンの免疫学的反応性のデモンストレーション

レジオネラ・ニューモフィラ 1 (*Legionella*

pneumophila 1, Philadelphia 1 単離体) のホルマリン化懸濁液を PBS バッファーで希釈して光学密度 1.00 (425 nm) に調整した。この懸濁液の 1:3 希釈物 (1 ml) を一連の円垂形マイクロ遠心分離管に入れた。細胞を遠心分離 (10 分、10000 RPM)、上清を傾瀉して細胞をマウスモノクローナル IgG 抗体を含む PBS ("10C8" 0.85 mg/ml) (1 ml) あるいは陰性対照としての PBS 中に 1:100 希釈物として再懸濁した。室温で 1 時間インキュベートした後、細胞を先と同じように遠心分離し、上清を傾瀉して細胞を PBS バッファー中に再懸濁し、再度遠心分離した。上清を傾瀉した後、細胞を貯蔵ルテニウム標識ウサギ及びヒツジ抗マウス IgG 抗体の 1:5 希釈物 (PBS 中) (1 ml、10 mg ルテニウム複合体/ml)、あるいは陽性対照としてフルオレセイン標識ヤギ抗マウス IgG 抗体の 1:50 希釈物 (PBS 中) (1 ml、0.5 mg IgG/ml)、あるいは陰性対照として PBS 中に再懸濁した。室温で 1 時間インキュベートした後、前と同じように細胞を遠心分離して上清を傾瀉し、細胞を PBS 中に再懸濁して前のように遠心分離で 2 回洗浄した。最後の洗浄の後細胞を PBS (1 ml) 中に再懸濁し、ポリ

スチレンキュベット中に移して蛍光光度測定分析に供した。

【0082】フルオレセイン標識ヤギ抗マウス IgG 抗体溶液の励起及び放射を精査したところ、491 nm に励起ピーク、519 nm に放射ピークが観察された。これ等の波長をフルオレセイン標識細胞の蛍光測定に使用した。ルテニウム標識ウサギ/ヒツジ抗マウス IgG 抗体溶液の励起及び放射を精査したところ、455 nm に励起ピーク、623 nm に放射ピークが認められた。これ等の波長をルテニウム標識細胞の蛍光測定に使用した。"10C8" 第 1 抗体及び蛍光性結合体の代りに PBS とインキュベートした細胞懸濁液を陰性コントロールとし、蛍光光度計のブランクに使用した。"10C8" 第 1 抗体と蛍光性結合体の両方と共にインキュベートした細胞懸濁液の蛍光を 100 とし、その他の全ての蛍光測定はこれ等の内部標準に対する相対的な蛍光単位で行なった。表 II に示した結果は、ルテニウム標識抗マウス IgG 結合体は蛍光を発生し、"10C8" 第 1 抗体の存在下で特異的な免疫学的反応性を示すことを表わしている。

【表 2】

	表 II	
	相対蛍光単位	
	フルオレセイン (519 nm)	ルテニウム (623 nm)
	1:3 細胞希釈	1:3 細胞希釈
第 1 抗体を有する 結合体の蛍光	100	100
第 1 抗体を有しない 結合体の蛍光	37	64
バックグラウンドの蛍光 (第 1 抗体を有するが 結合体は有さない)	6	48